

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Lukáš Kekrt

Molekulární mechanismy regulace virulence *Staphylococcus aureus*
Molecular mechanisms of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Jan Tkadlec, PhD

Praha, 2019

Rád bych poděkoval svému školiteli
Mgr. Janu Tkadlecovi, PhD a doc. MVDr. Oto Melterovi, PhD
za rady a předané zkušenosti při psaní této bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 23. 4. 2019

Podpis

Abstrakt

Staphylococcus aureus patří mezi nejvýznamnější původce bakteriálních infekcí člověka. Vyniká širokým spektrem faktorů virulence, které mohou ovlivňovat imunitní systém nebo přímo destruovat určité buňky a tkáně. Tato bakterie je ale také schopna dlouhodobě a asymptomaticky kolonizovat lidské tělo. Přesná regulace exprese faktorů virulence je pro vznik infekce, způsobené *S. aureus* klíčová. Tato práce se bude zabývat vybranými molekulárními mechanismy kontrolujícími expresi faktorů virulence *S. aureus*. Mezi tyto mechanismy patří quorum sensing systém *agr* (accessory gene regulator), sigma B obecně stresová odpověď, rodina transkripčních faktorů Sar a regulátory reagující na metabolické podmínky CodY a CcpA.

Klíčová slova:

S. aureus, virulence, quorum sensing, *agr* systém, *sar*, sigma B, CodY, hemolysin alfa.

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the most common causes of bacterial infection in human. The bacterium is equipped by the broad spectrum of virulence factors, including modulators of immune response and also invasion factors able to destroy human cells and tissues. *S. aureus* is also able to asymptotically colonize healthy individuals. Precise regulation of virulence factor expression is crucial for *S. aureus* survival. The aim of this thesis is to describe in detail molecular mechanisms regulating *S. aureus* virulence factor expression. Among these mechanisms belongs quorum sensing dependent *agr* system, sigma B general stress response, Sar family of transcription factors and metabolism-dependent regulators CodY and CcpA.

Keywords:

S. aureus, virulence, quorum sensing, *agr* system, *sar*, sigma B, CodY, alpha-hemolysin.

Obsah

1	Seznam zkratk	1
2	Úvod	3
3	Faktory virulence <i>S. aureus</i>	4
3.1	Adheziny	4
3.1.1	Protein A	4
3.2	Invaziny	5
3.2.1	Alfa hemolysin	5
3.2.2	Panton-Valentinův leukocidin (PVL)	6
3.2.3	Phenol-soluble modulins	7
4	Regulace virulence <i>S. aureus</i>	8
4.1	Quorum sensing	8
4.1.1	Quorum sensing via accessory gene regulator (<i>agr</i>)	9
4.1.2	Diverzita autoindukčních molekul	11
4.1.3	RNA III - regulační RNA <i>agr</i> systému	11
5	Sar regulační systém	12
5.1	SarA	12
5.1.1	Alternativní Sar regulační faktory	13
5.1.2	Regulační systém Rot a jeho vliv na virulenci <i>S. aureus</i>	14
6	ArlRS, MgrA regulační systémy	17
7	CodY-Sae regulační systém	19
8	Regulace virulence enviromentálními faktory	21
8.1	Sigma B obecně stresová odpověď	21
8.2	CcpA regulační systém	23
9	Závěr	25
10	Seznam použité literatury	26

1 Seznam zkratek

AMK	Aminokyseliny	Aminoacides
AIPs	Autoindukční peptidy	Autoinductive peptides
AI-2	Autoinduktor 2	Autoinductor-2
ADAM10	Receptor alfa toxinu	Receptor for alpha toxin
AHL	N-acylhomoserinový lakton	N-acylhomoserine lacton
CCR	Katabolická represe	Carbon-Catabolite Repression
CRE	Elementy katabolické odpovědi	Catabolite-Responsive elements
ClfA	Clumping faktor A	Clumping factor A
ClfB	Clumping faktor B	Clumping factor B
CapA	Kapsulární protein biosyntézy polysacharidů	Capsular protein of polysaccharide biosynthesis
<i>clfA/B</i>	gen clumping faktoru A/B	gene of clumping factor A/B
<i>coa</i>	gen koaguázy	gene of coagulase
<i>cidA</i>	gen mureinové hydrolázy	gene of murein hydrolase
<i>efb</i>	gen fibrinogen vázajícího proteinu	gene of fibrinogen-binding protein
Ebh	Extracelulární matrix-vázající povrchový protein	Extracellular matrix-binding protein
FnbA	Fibronectin vázající protein A	Fibronectin-binding protein A
<i>fnbA</i>	gen fibronectin vázajícího proteinu A	gene of fibronectin-binding protein A
<i>fnbB</i>	gen fibronectin vázajícího proteinu B	gene of fibronectin-binding protein B
FN3K	Fruktosamin-3-kináza	Fructoseamin-3-kinase
FnbB	Fibronectin vázající protein B	Fibronectin-binding protein B
<i>geh</i>	gen lipázy	gene of lipase
HlgAB	Gamma hemolysin AB	Gamma hemolysin AB
HlgCB	Gammahemolysin CB	Gamma hemolysin CB
<i>hla</i>	gen alfa hemolyzinu	gene of alpha hemolysin
<i>hlb</i>	gen beta hemolyzinu	gene of beta hemolysin
<i>hlg</i>	gen gamma hemolyzinu	gene of gamma hemolysin
IgG	Imunoglobulin G	Imunoglobulin G

IgM	Imunoglobulin M	Imunoglobulin M
LukAB	Leukocidin AB	Leukocidin AB
LukED	Leukocidin ED	Leukocidin ED
lytM	Mureinová hydroláza M	Murein hydrolase M
lytN	Mureinová hydroláza N	Murein hydrolase N
<i>lip</i>	gen triacylglycerolové lipázy	gene of triacylglycerol lipase
MRSA	Methicilin-rezistentní <i>S. aureus</i>	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i>
mAbs	lidské monoklonární protilátky	human monoclonal antibodies
<i>nuc</i>	gen extracelulární mikrokokové nukleázy	gene of extracellular micrococcal nuclease
PVL	Panton-Valentinův leukocidin	Panton-Valentine leukocidin
PSMs	Moduliny rozpustné ve fenolu	Phenol-soluble modulins
PSM α	Alfa modulin	Alpha modulin
PSM β	Beta modulin	Beta modulin
PSM γ	Gamma modulin	Gamma modulin
PIA	N-polyacetylglukosamid	N-polyacetylglucosamide
<i>seb</i>	gen enterotoxinu B	gene of enterotoxin B
SpA	Protein A	Protein A
<i>spa</i>	gen proteinu A	gene of protein A
<i>ssl7</i>	gen stafylokokových superantigenů	gene of staphylococcal superantigens
<i>splE</i>	gen serinové proteázy E	gene of serine protease E
TSST-1	Toxin syndromu toxického šoku	Toxin of toxic shock syndrome
<i>tst</i>	gen toxinu syndromu toxického šoku	gene of toxin of toxic shock syndrome
PD	Extracelulární prodoména	Extracellular prodomain
vWF	von Willebrandův faktor	von Willebrand factor

2 Úvod

Jedním z významných bakteriálních patogenů moderní doby je *Staphylococcus aureus*. Tato běžně komenzální bakterie, asymptomaticky kolonizující významnou část lidské populace může v určitých případech vyvolávat méně či více závažná onemocnění, jako jsou infekce kůže, endokarditidy (Salvador, 2017), osteomyelitidy, až po hluboké infekce a sepse, či nekrotizující pneumonie (Le, 2017). *S. aureus* má význam i z hospodářského hlediska, a to například vlivem podílu na mortalitě celosvětově rozšířené mastitidy skotu (Schmidt, 2017).

V humánní sféře infekce způsobené *S. aureus* postihují především imunodeficientní a slabší jedince, tedy zejména starší osoby, novorozence, nebo osoby imunodeficientní trvale, jako například pacienty trpící AIDS (Pedrosa *et al.*, 2018).

Podobně znám je *S. aureus* i pro silnou adaptaci na lidské tělo, a to především produkcí mnoha proteinů integrujících s faktory hostitele, jako například fibrinogen a fibronectin-vázající proteiny, kterými je schopen vázat a inaktivovat některé baktericidní molekuly, jako například rozpustné histony, apod. (Pietrocola, 2019). Především však pro velmi obtížnou léčbu, související s rezistencí vůči širokému spektru antibiotik, zejména beta-laktamového typu. Tento problém je reprezentován zejména šířením silně rezistentních kmenů MRSA, jak nemocničního, tak komunitního původu (Strauß, 2017; Holden, 2013).

S. aureus pro řízení své virulence využívá komplikované sítě regulačních mechanismů, které specificky ovlivňují produkci faktorů virulence, jako jsou hostitelské tkáně degradující exoproteiny, imunomodulační molekuly, povrchové adhezivní proteiny aj.

Význam *S. aureus* jakožto patogena je tedy značný. Tato práce si dává za cíl popsat nejvýznamnější molekulární mechanismy, které řídí schopnost *S. aureus* napadnout lidský organismus a způsobovat výše jmenovaná onemocnění, která mohou vyústit i v letální následky. Vzhledem k tomu, že regulačních kaskád, ovlivňujících expresi faktorů virulence nacházíme u kmenů *S. aureus* relativně velké množství, pojednává tato práce vzhledem k rozsahu pouze o vybraných příkladech, které jsou pro řízení virulence *S. aureus* nejzásadnější. Jedná se zejména o dvousložkové regulační systémy *agr*, proteiny rodiny Sar, sigma faktor B, CodY, či další, regulaci modulující dvousložkové systémy, jako ArlRS, či Sae.

3 Faktory virulence *S. aureus*

Staphylococcus aureus je po patogenní stránce bakterií silně adaptovanou na lidské tělo, vynikající produkcí velkého množství faktorů virulence, díky kterým je schopen úspěšně kolonizovat a invadovat hostitelskou tkáň.

Virulenční faktory *S. aureus* je možné rozdělit dle jejich biologické aktivity do tří skupin: 1. faktory virulence, podporující adhezi k buňkám a tkáním hostitele (adheziny), 2. faktory podporující poškození tkání a šíření *S. aureus* v hostiteli (invaziny) a 3. faktory, chránící bakterie před hostitelským imunitním systémem (evaziny).

3.1 Adheziny

Adheziny jsou významnou skupinou stafylokokových virulenčních faktorů, zodpovědných za přilnutí patogena k hostitelské tkáni vazbou na proteiny extracelulární matrix. Mezi nejdůležitější adheziny *S. aureus* patří ClfA, tedy Clumping factor A, protein vázající fibrinogen. Protein podobné funkce ClfB (Clumping factor B) se účastní například adheze k nosní sliznici, kde zprostředkovává vazbu k epitelovým buňkám. Druhou skupinou adhezínů, podstatných pro virulenci *S. aureus* jsou proteiny FnbA, FnbB vázající fibronectin (Soltani *et al.*, 2019). Významným adhezínem *S. aureus* je rovněž povrchový protein A.

3.1.1 Protein A

Pro *S. aureus* specifický, adhezivní povrchový protein A, o molekulové hmotnosti 42 kDa, je kotvený v buněčné stěně a napomáhá přilnutí k hostitelským buňkám. Jeho specifikem je vazba von Willebrandova faktoru (vWF), glykoproteinu séra, umožňující asociaci trombocytů s poškozeným endotelem, nebo proteinem A zprostředkovaná vazba receptoru tumor-nekrotizujícího faktoru (TNFR-1) (Clarke *et al.*, 2006).

SpA se svou aktivitou podílí na zvýšené proliferaci osteoklastů, tedy buněk zodpovědných za systematickou degradaci kostní tkáně. Zvýšením degradace kostní tkáně se protein A může podílet na kolonizaci a poškození kostní tkáně při stafylokokové osteomyelitidě (Ren *et al.*, 2017).

Mezi dominantní funkce SpA patří vazba na těžké řetězce protilátek IgG a IgM, konkrétně oblasti Fc γ 3 a VH3, čímž dochází k jejich chybné orientaci (vzhledem k normální

funkci protilátek) a imunoglobuliny nejsou schopné patogena rozpoznat, čímž se bakterie brání opsonizaci a fagocytóze (Kim *et al.*, 2016).

3.2 Invaziny

Stafylokokové invaziny jsou patogenem vylučované exoproteiny (toxiny), které se přímo účastní poškozování hostitelských tkání. Síla, povaha a koncentrace toxinů je často faktorem, definujícím závažnost onemocnění (Zhang, 2017). V následující části jsou vybrané invaziny podrobněji popsány.

3.2.1 Alfa hemolysin

Jednou z nejvýznamnějších skupin invazinů, produkovaných většinou kmenů *S. aureus* jsou hemoliziny. Tyto proteiny jsou schopné cytolyticky napadat jak erytrocyty, tak i rozsáhlé spektrum dalších hostitelských buněčných typů, jako epidermální a endotelové buňky. Bylo zjištěno, že alfa hemolysin rovněž napomáhá inhibici funkce hostitelských makrofágů a ustanovení perzistence infekce uvnitř těchto buněk (Koziel, 2015).

Nejběžnějším toxinem skupiny hemolizínů je alfa toxin (alfa hemolysin), uplatňující se v patogenezi řady stafylokokových infekcí, jako například endokarditidy, pneumonie (Bartlett, 2008), osteomyelitidy, sepse, či kožních nekrot (Le, 2016). Jeho produkci ovlivňuje síť regulačních systémů, zejména *agr* lokus a další přídavné systémy řídící virulenci (Shambat *et al.*, 2014).

Alfa hemolysin náleží do skupiny póry-tvořících toxinů, což demonstruje jeho cytolytický efekt. Při produkci patogenem dochází k vazbě s jeho hostitelským receptorem, disintegrin-metaloproteinázou (ADAM10), nacházejícím se na extracelulární straně invadované buňky. Tento receptor je běžným povrchovým proteinem lidských buněk, který se za normálních okolností podílí na buněčném vývoji a diferenciaci. Jeho vysoká afinita k alfa hemolysinu ve spojení s jeho N-koncovou extracelulární prodoménou (PD) je ovšem spouštěčem cytotoxické kaskády, která může vyústit v buněčnou smrt (Von Hoven, 2016).

Alfa hemolysin vyžaduje pro svou aktivitu kromě receptoru také sfingomyelin, respektive jeho fosfocholinovou skupinu, kterou rozeznává a po jeho navázání se skládá v heptamerní pór, kterým narušuje hostitelskou membránu (Brauweiler, 2014). Alfa

hemolysin také podporuje tvorbu kyselé sfingomyelinázy, jejíž enzymatická činnost má za následek destrukci hostitelských tight junctions, vedoucí k degradaci endotelové tkáně a vzniku plicních edémů. Potlačení aktivity této sfingomyelinázy je jedním z cílů současné léčby onemocnění způsobených alfa hemolyzinem (Becker *et al.*, 2018).

Pro účinek alfa hemolysinu je zásadní tvorba 1-3 nm póru skrz hostitelskou membránu a s ní související zvýšená iontová propustnost. Alfa toxin kromě samovolného úniku iontů, také neznámým způsobem posiluje ve vyšších koncentracích proteolytickou aktivitu disintegrin-metaloproteinázy ADAM10, štěpící adhezivní E-kadheriny, zodpovědné za mezibuněčný kontakt, čímž podporuje rozpad tkání (Von Hoven, 2016). Zvýšená aktivita ADAM10 může také vést k vyšší buněčné migraci a podporovat metastazování nádorových buněk (Ma, 2016).

3.2.2 Panton-Valentinův leukocidin (PVL)

Významnou skupinou stafylokokových evasinů a zároveň invazinů jsou leukocidiny, dvousložkové toxiny, schopné oligomerizace na povrchu buněčné membrány a tím degradace lipidických dvouvrstev hostitelských leukocytů. U humánních kmenů *S. aureus* nacházíme produkci až pěti druhů leukocidinů: HlgAB, HlgCB (gamma hemolysiny AB, CB), LukED (leukocidin ED), LukAB (leukocidin AB, jinak také LukGH) a PVL, neboli Panton-Valentinův leukocidin, (jinak také LukSF-PV) (Chan *et al.*, 2019). Tyto toxiny dvojicí podjednotek F a S interagují s hostitelskými povrchovými receptory. S podjednotka leukocidinu interaguje s hostitelským receptorem a indukuje tak jeho konformační změnu, čímž umožňuje navázání podjednotky F a vznik oktamerního póru. Ty následně zapříčiňují osmotickou nerovnováhu napadené buňky vedoucí k její lýze.

Cytotoxická aktivita leukocidinů je soustředěna na lýzu neutrofilů, monocytů a makrofágů. Zaznamenána byla i eliminace dendritických buněk, zprostředkovávajících hostiteli tvorbu cytokinů, látek protizánětlivého charakteru, či prezentaci protimikrobiálních antigenů lymfocytům (Berends *et al.*, 2019).

Z hlediska závažnosti onemocnění hraje mezi leukocidiny pravděpodobně nejvýznamnější roli PVL, neboli Panton-Valentinův leukocidin. Je zodpovědný za řadu vážných onemocnění, jako je nekrotizující pneumonie a závažné typy infekce kůže a měkkých tkání. Často s vysokou mortalitou (Spaan *et al.*, 2013).

3.2.3 Phenol-soluble modulins

Čtvrtou, pro tuto práci významnou skupinou stafylokokových faktorů virulence jsou phenol-soluble modulins, neboli moduliny s výraznou cytolytickou aktivitou, rozpustné ve fenolu, přičemž tato schopnost je zapříčiněna amfipatickým charakterem molekul a alfa helikální strukturou. PSMs zajišťují jednak pravděpodobně nejúčinnější lýzu hostitelské buňky, jednak únik před imunitním systémem. Ten zprostředkovává kupříkladu $\text{PSM}\alpha$, který *S. aureus* napomáhá úniku z fagosomu (Grosz, 2014). Sjednocují tak v jedné skupině virulenčních faktorů charakter jak invasinů, tak zároveň evasinů, napomáhající patogenovi přežít v hostitelském prostředí (Richardson, 2018).

Byly popsány tři různé typy PSMs a to $\text{PSM}\alpha$, $\text{PSM}\beta$ a $\text{PSM}\gamma$, přičemž $\text{PSM}\gamma$ je ekvivalentem gamma-toxinu, tyto peptidy se také účastní tvorby stafylokokového biofilmu (Dastgheyb *et al.*, 2015).

4 Regulace virulence *S.aureus*

S. aureus jakožto úspěšný lidský komenzál a příležitostný patogen aktivně reaguje na změny hostitelského organismu, jako je množství metabolitů, pH, dostupnost kyslíku, a přizpůsobuje jim genovou expresi, včetně faktorů virulence, kterými může napadat hostitelské tkáně. K tomuto účelu využívá řady regulačních mechanismů.

4.1 Quorum sensing

Populační denzita je jedním z nejpodstatnějších parametrů ovlivňující regulaci virulence *S. aureus*. Reakce na nárůst populační denzity funguje v procesu regulace virulence jako komunikační aparát pro společné načasování genové exprese a synchronizovanou reakci například prostřednictvím produkce toxinů. K tomuto účelu slouží molekulární mechanismus zvaný quorum sensing (Rutherford, 2012).

Mechanismus quorum sensing signalizace je zprostředkován vazbou signální molekuly na receptor, která indukuje změnu transkripční aktivity určitých genů, včetně těch, které pozitivním způsobem zpětně ovlivňují syntézu induktorových molekul. Produkce autoinduktoru jednou buňkou je velmi nízká a je málo pravděpodobné, že by bakteriální buňka zachytila svůj vlastní induktor, proto je quorum sensing závislé právě na populační denzitě. Překročení prahové hodnoty koncentrace induktorů (quorum), vyvolané rostoucí bakteriální biomasou způsobí zpětně syntézu většího množství induktorů.

Tento systém zajišťuje pozitivní zpětnou vazbu a plnou aktivaci receptoru, což způsobuje, že je transkripce časově synchronizována. Aktivace receptorů indukuje expresi dalších specifických genů. Tato transkripční koordinace je klíčovou funkcí quorum sensing signalizace (Somerville, 2009).

Bakterie, využívající quorum sensing, produkují pro komunikaci specifické signální molekuly. U grampozitivních bakterií se jako induktory uplatňují modifikované oligopeptidy (autoinducor peptides, AIP), u gramnegativních pak N-acyl homoserinové laktony (AHL). U obou bakteriálních skupin nachází uplatnění třetí, k oligopeptidům a homoserinovým laktonům paralelní rodina autoindukčních peptidů, autoinductor-2 (AI-2) (Verbeke et al., 2017).

Polymorfismus aminokyselinové sekvence autoindukčního peptidu a odpovědný receptor AIPs rozděluje kmeny *S.aureus* do čtyř tříd (Wright III, 2004). Quorum sensing signalizace může u rodu *Staphylococcus* fungovat i mezidruhově. V praxi to znamená, že

AIP, produkované jinými druhy stafylokoků mohou inhibovat quorum sensing signalizaci u *S. aureus* (Otto, 2001; Canovas *et al.*, 2016).

4.1.1 Quorum sensing via accessory gene regulator (*agr*)

U *S. aureus* je quorum sensing reprezentován systémem *agr* (accessory gene regulator, neboli přídavný regulátor genů). Za stavu vysoké populační denzity zvyšuje *agr* expresi toxinů, degradačních exoenzymů a snižuje expresi mnoha kolonizačních faktorů.

Tato regulace je zásadní pro načasování produkce virulenčních faktorů při infekci, což je podmínkou vzniku akutního onemocnění. *agr* systém se vyskytuje také u jiných druhů stafylokoků, (Dufour, 2002).

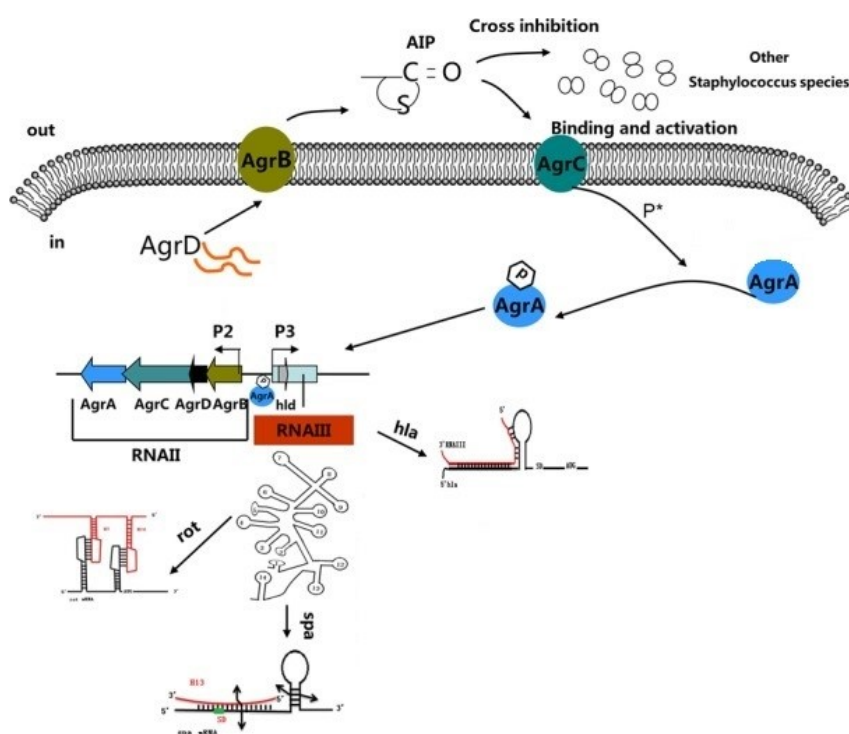
V experimentálních podmínkách vykazuje *agr* lokus maximální aktivitu v pozdní exponenciální fázi (Kumar, *et al.*, 2017). Při úplné ztrátě aktivity *agr* lokusu dochází k významné redukci virulence a schopnosti vyvolat infekci u takto postiženého kmene. Delece *agr* může na druhou stranu také vést ke zvýšené odolnosti vůči antibiotikům, jako je gentamicin nebo ciprofloxacin, k odolnosti k oxidativnímu stresu, nízkému pH, či vysoké teplotě a přispívat k průběhu chronické infekce (Kumar *et al.*, 2017).

Díky efektivně řízené expresi virulenčních faktorů jsou *agr*-aktivní stafylokoky schopné napadat široké spektrum tkání, od kůže až po tkáň srdeční svaloviny (Somerville, 2009).

agr lokus je klíčovým uzlem takřka všech systémů, spojených s regulací virulence *S. aureus*. Obsahuje dva promotory, P2 a P3, s rozdílnými produkty genové exprese. Promotor P2 je klíčový v expresi jednotlivých komponent *agr* systému (AgrA, AgrB, AgrC a AgrD). Protein AgrC je transmembránová senzorová histidin kináza a společně s response regulátorem AgrA, tvoří AgrC dvousložkový senzorický systém klíčovou komponentu *agr* systému (Wang, 2014). Dále je z P2 transkribován AgrD, krátký prekurzorový peptid, který zpracovává AgrB v thiolaktonový peptid (autoindukční peptid plnící komunikační funkci v systému quorum sensing) (Zhang, 2002). Kromě toho vykazuje N-koncová aminokyselinová doména AgrD, která pomáhá cílit prekurzor na buněčnou membránu, vysokou sekvenční podobnost s PSMs, zmíněných v kapitole týkající se hlavních skupin faktorů virulence. Po odstřižení signálního peptidu AIP se uvolní N-koncová doména podílí na aktivitě PSMs a bylo prokázáno, že sama o sobě vykazuje cytolytickou aktivitu (Schwartz *et al.*, 2014).

Dosažení prahové hodnoty koncentrace autoindukčního peptidu vede ke tvorbě komplexu s AgrC a aktivaci kinázové domény transmembránové histidin kinázy (Somerville, 2009).

Poté, co je kinázová doména AgrC fosforylována, je fosfát přenesen na AgrA (rovněž transkribovaného z P2 promotoru), který se následně spolu s AgrC podílí na buněčné odpovědi *agr*. Fosforylací je AgrA aktivován a pozitivní zpětnou vazbou výrazně zvyšuje transkripci z P2 a P3 promotorů. Transkripce z P2 je tedy typem autokrinní signalizace, neboť umožňuje syntézu molekul, které zpětně zvyšují transkripci z P2. viz obrázek č. 1. (Reynolds, 2011).



Obr. 1: Schéma funkce *agr* systému, jeho promotorů a vliv na další podřízené lokusy, podrobněji popsanych v dalších kapitolách (Tan, 2018).

Studie prokázala, že AgrA vykazuje vyšší afinitu k promotoru P2, která je podpořena přidáním fosforového donoru, acetylfosfátu. Rozdílná afinita mezi těmito dvěma promotory je výsledkem sekvenčního rozdílu 2 bp mezi downstream přímými opakováními míst P2 a P3 (Koenig, 2004).

P2 transkripce je tedy výhradně orientována na přepis funkčních komponent signální kaskády *agr* systému, P3 transkripce pak představuje cestu k syntéze molekul regulujících přímo produkci virulencních faktorů (Bezar, 2019).

4.1.2 Diverzita autoindukčních molekul

agr systém je u kmenů *S.aureus* různorodý a je dělen do čtyř tříd (třída I až IV). Tato divergence je způsobena sekvenční odlišností jednotlivých autoindukčních molekul, dělíci signalizační AIPs do čtyř skupin. Například AIPs skupiny I a IV jsou oktapeptidové, liší se však v jedné aminokyselině (Asp, Try).

Tato drobná odchylka v sekvenci vede následně k rozmanitosti AgrC, tedy cílových receptorových histidin-kináz, které autoindukční molekuly rozeznávají a fosforylací dále spouštějí signalizační kaskádu. Zatímco se autoindukční peptidy mohou lišit pouze v jedné aminokyselině, jejich transmembránové receptory jsou výrazně variabilnější (Geisinger, 2008).

Rozmanitost AgrC receptorových histidin-kináz se týká především C-terminálních extracelulárních senzoričkových domén, které zachycují thiolaktonové části peptidů a dle své sekvence reagují aktivačně, či naopak inhibičně. Tím je zajištěno, že nedochází ke cross-aktivaci mezi různými třídami *agr* systému (Jensen, 2008).

4.1.3 RNA III - regulační RNA *agr* systému

Transkripcí z P3 vzniká nepřekládaná RNA III. Ta je riboregulátorem, tedy RNA schopnou regulace translace různých transkriptů. Jde o jednu z největších prokaryotických regulačních RNA molekul (512 nt) a reguluje expresi virulenčních faktorů prostřednictvím interakcí, zprostředkovaných specifickými oblastmi RNA III sekundární struktury. Důležitou oblastí pro interakci s mRNA, kódující virulenční faktory je zejména její 3' doména (Boisset *et al.*, 2007).

Pomocí mechanismu antisense regulace, tedy vazbou cílové mRNA pomocí specifické smyčky RNA III negativně ovlivňuje syntézu transkripčně-regulačních systémů, které inhibují produkci virulenčních faktorů, jako například systém Rot, a tím významně zesiluje syntézu sekretovaných virulenčních faktorů (Boisset *et al.*, 2007). Zvýšená exprese RNAIII, díky mutaci inhibičně působícího regulátoru RpiRC, vede ke zvýšení exprese *hla* a *capA*, naopak inhibuje translaci povrchových proteinů, jako je například protein A (Gaupp, 2016).

Aktivita RNA III je zároveň regulována pomocí RNAsy III (endoribonukleázy III), která narušuje vazbu RNA III-mRNA komplexu (Lioliou *et al.*, 2012).

5 Sar regulační systém

Významnou sesterskou regulační komponentou k *agr* je funkčně široce obsáhlá rodina přidavných regulačních proteinů Sar (staphylococcal accessory regulator). Tyto regulační proteiny nejúžším způsobem kooperují se spojujícím *agr* a skrze koordinaci jeho aktivity se mnoha způsoby podílí na řízení virulence *S. aureus*. Nejvýznamnějšími zástupci jsou SarA, dále SarT, SarU, SarS, SarR, SarZ či Rot. Přídavně se pak na regulaci virulence podílejí SarX, či SarV (Manna, 2004).

5.1 SarA

Klíčový regulátor *sarA*, ovlivňující expresi genů *agr* lokusu. Samotný *sarA* lokus obsahuje tři promotory, P1, P2 a P3, produkující částečně se překrývající transkripty *sarA*, *sarB* a *sarC*, se shodným 3' koncem. Exprese z jednotlivých promotorů není rovnocenná a je aktivována na základě environmentálního stresu, kterému je bakterie vystavena a jemu odpovídajících regulačních faktorů, například P3 promotor je takto regulován pomocí SigB (Miyazaki, 1999).

SarA se následně může vázat například do AT bohatých oblastí *agr* promotorů P2 a P3 (Manna, 2001) zvyšovat transkripci jak RNAII (*argBCDA*), tak RNAIII, a nepřímo tak usnadňovat produkci faktorů virulence (*hla*), a zároveň potlačovat expresi genů, souvisejících s adhezí, tvorbou biofilmu apod. (*spa*) (Xiong, 2006). SarA dále potlačuje transkripci *cna*, kódující kolagenový adhezín pomocí *sarA*. SarA zároveň aktivuje produkci fibronektinu a fibrinogen-vázajících proteinů (Abdelhady, 2014).

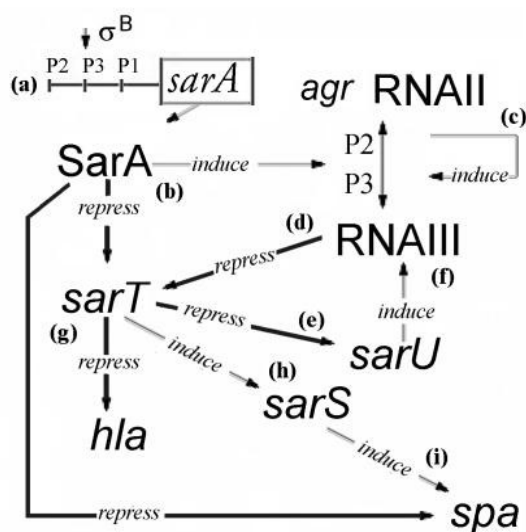
Podpora exprese z *agr* promotorů se také liší dle stavu bakteriální populace. Zatímco v okamžiku nízké populační hustoty aktivuje *sarA* transkripci především z P2 promotoru, v momentě postexponenciální fáze růstu a vysoké hustoty podporuje naopak expresi z P3 (Rechtin, 1999).

Tato regulační cesta SarA je tedy *agr*-dependentní. SarA může ale také *agr*-independentně vázat konzervované oblasti zvané Sar boxy, nacházející se v promotorech genů, kódující různé adhezivní proteiny, jako je protein A, či naopak toxinů, jako alfa-hemolysin apod. (Dunman *et al.*, 2001).

5.1.1 Alternativní Sar regulační faktory

Podstatné pro funkci celého *sar* lokusu je funkční propojení s ostatními homologními Sar proteiny, které svou rozmanitou regulační aktivitou *agr* a SarA doplňují. Jedná se zejména o SarS, SarR, SarT, SarU, Rot, pro řízení virulence pak méně zásadní SarX, SarV, či SarZ.

Tyto doplňkové homology SarA ovlivňují zejména transkripci z majoritního *agr*, patrná je ovšem i vzájemná regulace. SarU, skládající se ze dvou regulačních částí specificky homologních k SarA, SarU1 a SarU2, je v systému regulace virulence *S. aureus* faktorem, který svou vazbou cílové DNA podporuje syntézu například fibronektin-vázající proteiny a některých exotoxinů, zejména alfa hemolysinu. Aktivačně také působí na transkripci z promotorů *agr* lokusu, čímž podporuje tvorbu RNAIII. SarT, uplatňující se zejména v exponenciální fázi růstu, má schopnost vázat promotor SarU a tím inhibovat jeho expresi a následnou produkci virulenčních faktorů, zpětně je SarT ovšem kontrolován za pomoci SarA, který svým negativním vlivem na jeho transkripci udržuje hladinu exprese alfa toxinu (Schmidt *et al.*, 2001). Regulační vliv SarU, SarT a SarA na expresi *agr* a dalších genů popisuje obr. č. 2.



Obr. 2: Regulační vliv významných faktorů rodiny Sar (Schmidt, 2003).

Dalším proteinem této řady je SarS, fungující jakožto aktivátor exprese *spa* (Oscarsson, 2015) a inhibitor syntézy toxinů. Indukcí produkce adhezínů je tak antagonistou inhibičně působícího SarU. SarS je stejně jako SarU regulován pomocí vazby SarT, zde ovšem pozitivně.

Výsledkem tak je dualistický charakter SarT regulačního faktoru, který syntézu faktorů virulence podporuje (adheziny), ale i omezuje (toxiny) (Manna, 2003).

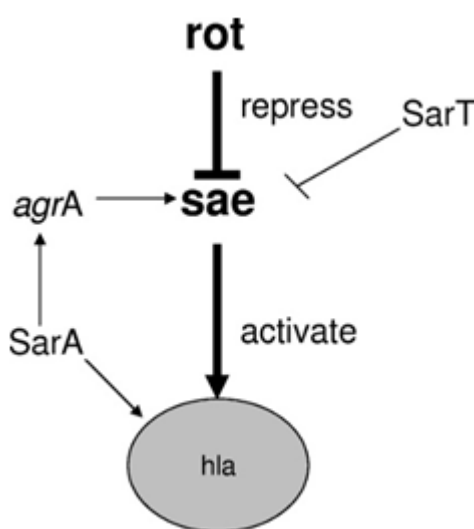
Zpětnovazebně v systému *sar* funguje regulátor SarR, který vazbou promotorů *sarA* potlačuje expresi SarA, *hla*, *hly*, i *spa* během postexponenciální fáze (Manna, 2001).

Podobně jako SarU aktivuje syntézu toxinů i regulátor SarZ. SarZ negativně reguluje SarA, přímou vazbou na promotory naopak podporuje expresi *hla*, a účastní se také inhibice formování biofilmu (Tamber, 2009).

Člen *sar* rodiny SarV není transkribován, nebo v minimálním množství a jeho vliv na regulaci virulence doposud není jasný. Je však patrné, že je jeho exprese blokována pomocí SarA a MgrA, pravděpodobně je tedy záložním regulátorem klasické *sarA* regulační kaskády (Manna, 2004).

5.1.2 Regulační systém Rot a jeho vliv na virulenci *S. aureus*

Dalším významným regulátorem virulence na úrovni transkripce u *S. aureus* je Rot (repressor of toxins). Tento globální regulátor s DNA vazebnou funkcí se podílí na kontrole syntézy biofilmu a s ním korelující ovlivnění produkce exotoxinů. Rot je nezbytný pro tvorbu biofilmu, neboť inhibuje produkci proteáz, které tvorbě biofilmu brání (Mootz, 2015). Zároveň je jeho exprese negativně regulována antisense RNA III (Geisinger, 2006). Rot je součástí výše zmíněné rodiny regulačních proteinů Sar, která přímo interaguje s hlavním, virulenci *S. aureus* řídícím lokusem *agr*. Expresí *rot* dochází k potlačení syntézy invazinů, tedy například represi produkce alfa toxinu (*hla*) (viz obrázek č. 3), dále např.

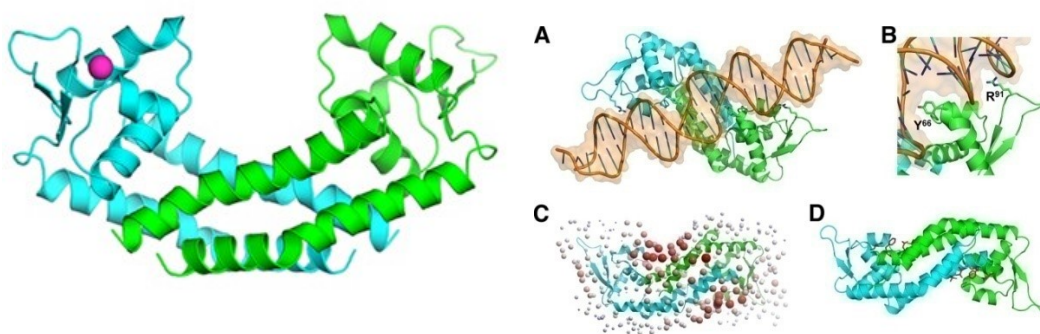


Obr. 3: Systém inhibice *hla* pomocí Rot, včetně vlivu dalších regulačních lokusů (Li, 2008).

beta toxinu (*hly*), serinových proteáz (operony *splABCDEF*, *sspABC*), lipáz (*geh*), či komponent gamma-hemolysinu (*hlyB*, *hlyC*) (Said-Salim *et al.*, 2003). Celkem má inhibiční efekt na 60 genů (Mootz, 2015).

Naopak Rot podporuje spolu s DNA vazebným regulátorem SpoVG transkripci genů, jejichž produkty spojené s buněčnou stěnou se účastní adheze k extracelulární matrix, jako je například *spa* (protein A), clumping factor B, (Zhu, 2019), *ssl7* (stafylokokový superantigen podobný protein) (Benson, 2012), nebo *lytN*, *lytM* (mureinové hydrolázy) (Chu, 2013). Rot takto pozitivně ovlivňuje expresi 86 genů (Mootz, 2015), mechanismus, kterým cílové promotory rozeznává však zatím známý není (Killikelly *et al.*, 2015).

Tato duální transkripční funkce inhibice/aktivace je dobře známa i u jiných významných regulátorů, jako je *agr*, či *sar* a spoluvytváří další díl komplikované sítě, řídící virulenci *S. aureus*. Inhibiční vliv na transkripci lokusu *rot* má například *agr* lokus, který svou antisense RNAIII váže mRNA transkribovaného *rot* (Jelsbak, 2010).



Obr. 4: Struktura Rot a jeho mechanismus vazby na cílové promotory (Killikelly *et al.*, 2015).

Produkt Rot při vazbě na cílové promotory dimerizuje, přičemž každý monomer nese helix-turn-helix motiv, kterými interaguje s malým žlábkem DNA. Zásadní pro úspěšnou vazbu Rot je také tyrosin v pozici 66 (viz obrázek č. 4), který interaguje s velkým žlábkem a pomáhá dimeru Rot s promotory asociovat (Killikelly *et al.*, 2015).

5.1.2.1 Regulace exprese rot a SpoVG

Jak bylo řečeno, regulační protein Rot je ve své funkci zásadně ovlivňován dalšími faktory. Tím nejvýznamnějším a Rot přímo ovlivňující je regulační systém SpoVG, který má vazbou na cílové promotory pozitivní vliv na expresi *rot* (Zhu *et al.*, 2019).

SpoVG byl původně objeven u *B. subtilis* jako regulátor sporulace, kterou spolu s asymetrickým dělením bakterie fyziologicky umožňuje. Mimo jiné se u *B. subtilis* podílí na hemolýze podporou produkce hemolyzinu (Pan *et al.*, 2014).

U nesporulujícího *S. aureus* je znám pro svou účast na tvorbě pouzdra podporou transkripce *cap*, produkci extracelulárních proteáz, nukleáz, a to regulací transkripce příslušných faktorů virulence, tedy genů *nuc*, *splE* (serinová proteáza E), *lip* (lipáza) aj. (Schulthess, 2011).

SpoVG váže promotory genů regulujících syntézu buněčné stěny jako je *lytN* (mureinhydroláza), jejíž expresi negativně ovlivňuje, naopak aktivuje expresi *femA* (tvorba glykopeptidových vazeb) a *lytSR* (dvousložkový regulační systém). Zároveň podporuje expresi *lgrA*, což vede k dalšímu potlačení aktivity mureinhydrolázy. Při zvýšené transkripci SpoVG byla pozorována zvýšená rezistence k oxacilinu (Liu *et al.*, 2016b).

Po aktivaci fosforylací serin-threonin kinázou Stk1 může SpoVG vazbou na promotory podporovat expresi buď přímo samotného rot, či pomocí rot-regulovaných genů. Kromě toho ovlivňuje zmíněná Stk1 i další regulátory, jako SarA, MgrA, LuxS, GraR, VraR, či CcpA (Bischoff, 2016).

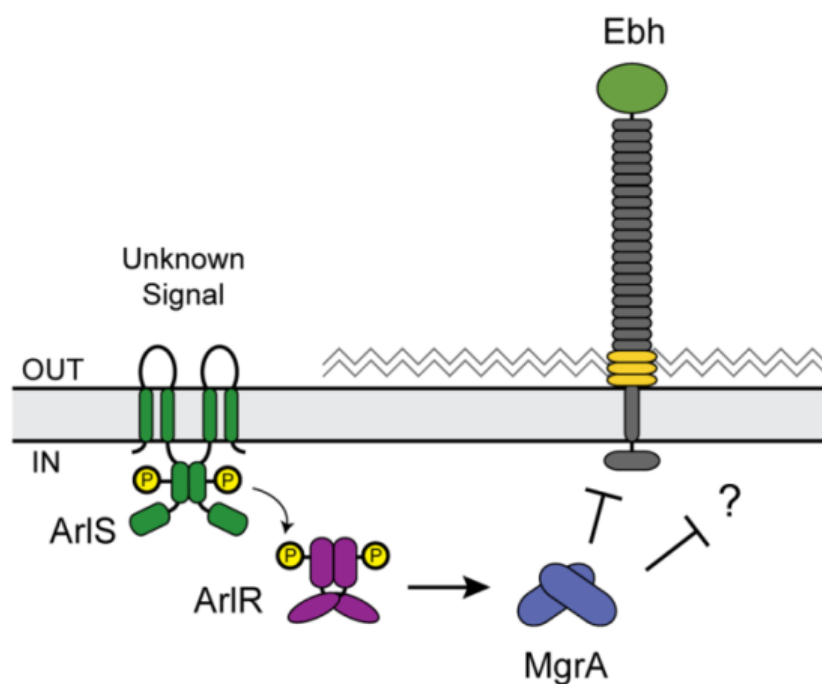
Vazba na tyto promotory je buď rot-dependentní, či independentní. Aktivita SpoVG je stejně jako Rot soustředěna na regulaci vazby *S. aureus* k povrchům pomocí produkce adhezivních molekul (Zhu *et al.*, 2019).

6 ArlRS, MgrA regulační systémy

Jak již bylo řečeno, dvousložkové regulační systémy se významně podílí na regulaci virulence u *S. aureus*. Mimo *agr*, či *sae* lokusu se jedná například o víceúčelný ArlR/ArlS systém, který ovlivňuje mnoho genů podílejících se na patogenezi stafylokokových infekcí (Fournier, 2001).

Dvousložkový systém ArlRS sestává z dvou produktů, regulátoru ArlR a senzorké histidin kinázy ArlS, a je primárně soustředěn na regulaci aglutinace v přítomnosti lidské plasmy nebo fibrinogenu (clumping), tvorbu biofilmu a podílí se tak na regulaci rezistence k oxacilinu u MRSA (Bai, 2019).

V reakci na dosud nepopsaný signál je tento regulační systém schopen ovlivnit syntézu mnoha povrchových proteinů, spojených s buněčnou stěnou. ArlS je po aktivaci fosforylován, načež akceptované fosfáty přenáší na ArlR a aktivuje jej (viz obrázek č. 5).



Obr. 5: Mechanismus regulační kaskády ArlRS, exprese regulátoru MgrA a povrchového proteinu Ebh, esenciálního pro tvorbu biofilmu (Crosby *et al.*, 2016).

Fosforylovaný regulátor ArlR může následně vazbou k promotoru indukovat expresi MgrA, DNA vazebného regulačního proteinu, který ovlivňuje široké spektrum cílových genů spojených s virulencí. Jedná se například o potlačení exprese genů pro povrchové proteiny buněčné stěny Ebh, SraP a SasG, nezbytných pro tvorbu biofilmu a naopak

znemožňujících aglutinaci stafylokokových buněk (Walker, 2013). MgrA zprostředkovaná represe výše zmíněných proteinů, zejména Ebh umožňuje vazbu ClfA (clumping faktoru A) na hostitelský fibrinogen a pro agregaci stafylokoků do typických klastrů (Crosby *et al.*, 2016).

Nejde však o tvorbu shluků podobného charakteru jako je tomu u biofilmu, ale o relativně primitivnější uspořádání, schopné výrazně efektivněji rychlého rozpadu a opětovného složení. Tvorba klastrů byla u *S. aureus* popsána jako významný faktor v patogenezi stafylokokové infekce, zejména u septikémií a infekčních endokarditid (Walker, 2013).

7 CodY-Sae regulační systém

Další možností, jakou *S. aureus* reguluje přechod z komenzální bakterie na patogena je regulační systém, propojující protein CodY a dvousložkový regulační systém SaeR/S.

Je známo, že přechod bakterie na patogenní styl života je často spojen s nutností přežít stresové podmínky. U *S. aureus* se jedná zejména o nízkou dostupnost živin, kdy v momentě vyčerpání živin přichází nutnost zisku z alternativních zdrojů. Tím jsou především hostitelské tkáně, které *S. aureus* invaduje pomocí produkce specifických toxinů. Senzorem nízké dostupnosti živin je právě CodY, který snímá především hladiny leucinu, valinu, isoleucinu a intracelulární koncentrace GTP (Waters *et al.*, 2016).

Dvousložkový regulační systém Sae, řídící expresi více než 20 faktorů virulence (Liu, 2016) je regulován pomocí CodY, který působí jako jeho negativní regulátor exprese (Majerczyk *et al.*, 2008). Zmíněný lokus Sae sestává z promotorů P1 a P3, přičemž exprese ze silného P1 promotoru umožňuje transkripci *saePQRS*, tedy všech čtyř produktů sae operonu, transkripčně slabší P3 promotor pak zprostředkovává expresi pouze *saeR* a *saeS*.

Pro syntézu faktorů virulence jsou ovšem nezbytné oba tyto promotory (Jeong *et al.*, 2011). CodY reguluje expresi Sae vazbou promotorové oblasti P1 a blokuje vazbu pozitivního aktivátoru SaeR (Mlynek *et al.*, 2018).

Pro aktivitu CodY je důležitá dostupnost živin. Za stavu vysoké koncentrace živin je exprese *sae* z P1 promotoru pomocí tohoto proteinu inhibována. Zároveň CodY inhibuje i regulační aktivitu *agr* lokusu. S nižší koncentrací živin dochází k potlačení této blokace, uvolnění CodY z promotoru *sae* lokusu a dochází k transkripci příslušných genů.

Aktivní složkou regulačního systému Sae jsou proteiny SaeS a SaeR. SaeS je transmembránová histidin kináza, která po autofosforylaci přenáší fosfát na SaeR, čímž ho aktivuje. Fosforylovaný SaeR může následně nasedat na promotory cílových genů.

Geny regulované pomocí SaeR se dělí do dvou tříd: promotory cílových genů třídy II mají vysokou afinitu k SaeR, jedná se například o *hla* (alfa toxin), nebo *hly* (beta toxin). Promotory cílových genů třídy I jsou nízkoafinitní a vyžadují vazbu dvou molekul fosforylovaných SaeR. Jedná se například o geny *coa* (koaguáza), *efb* (fibrinogen-vázací protein) a *fnbA* (fibronektin-vázací protein) (Mainiero, 2010). SaeR svou vazbou rovněž nasedá na P3 promotor, čímž zpětnovazebně podporuje svou vlastní produkci. V této vazbě ovšem kompetitivně soupeří se zmíněným inhibitorem CodY (Mlynek *et al.*, 2018).

Přídavné produkty SaeQ, SaeP kooperují s transmembránovou histidin kinázou SaeS a interagují s její extracelulární a intracelulární doménou. SaeP je lipoprotein, interagující

s extracelulární části SaeS. SaeQ je membránový protein vázaný k vnitřní straně membrány. Transkripce SaeQ/P jakožto celek snižuje aktivitu SaeR/S, jelikož jejich interakce s SaeS aktivuje jeho fosfatázovou aktivitu. Můžeme tak usuzovat, že podpůrné komponenty, které SaeQ/P tvoří, jsou jakási brzda SaeR/S regulačního systému (Liu *et al.*, 2016a).

Příkladem regulačního působení CodY může být také enzym ureáza, který je významným faktorem virulence při chronických stafylokokových infekcích ledvin. Močovinu přítomnou v ledvinách ve značné koncentraci rozkládá ureáza na CO₂ a amoniak. Tím umožňuje *S. aureus* odolávat kyselému stresu. Je známo, že ureázový operon negativně reguluje právě CodY a pozitivně naopak *agr*, nebo CcpA (Leiba *et al.*, 2012). Inhibiční regulace pomocí CodY je nepřímá a dochází k ní díky potlačení transkripce genů *agr* lokusu (Zhou *et al.*, 2019).

8 Regulace virulence enviromentálními faktory

8.1 Sigma B - obecně stresová odpověď

Během života v hostiteli je podstatné, aby byl *S. aureus* schopen včas zareagovat na změny v okolním prostředí, jako je působení imunitní odpovědi hostitele, stresové podmínky a další. K tomu slouží obecný regulátor, fungující napříč širokým spektrem bakteriálních druhů, sigma faktor B (SigB). Z klinického pohledu se uplatňuje především při chronických onemocněních, jako jsou například hluboké infekce kostí a hraje významnou roli ve fenoménu bakteriální perzistence (Tuchscherr, 2015).

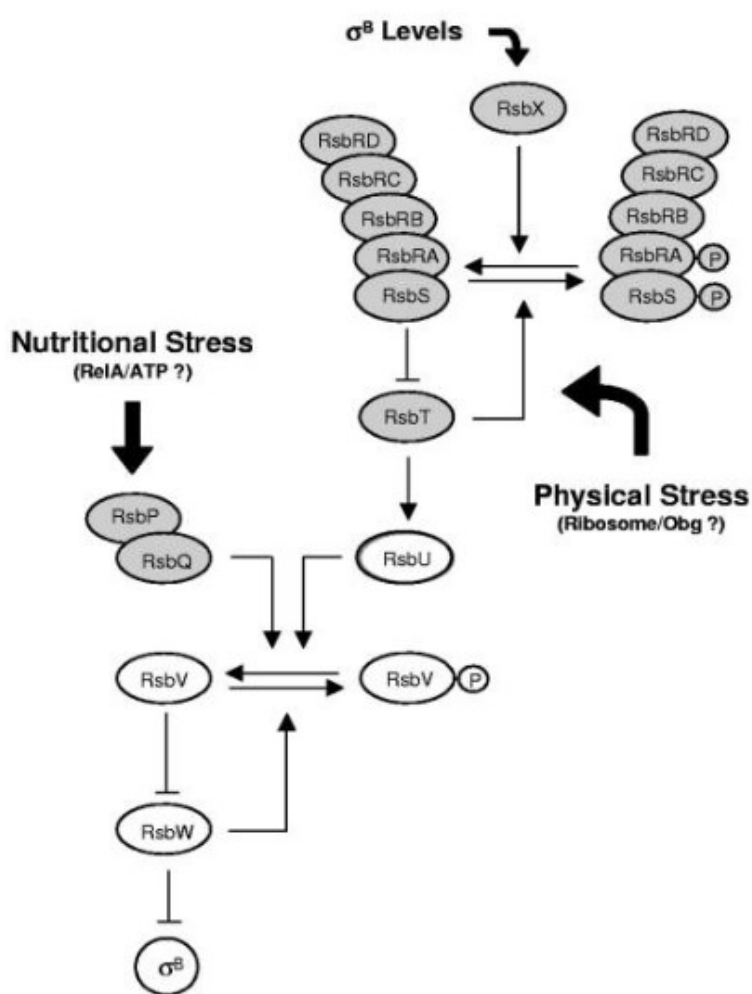
SigB na základě enviromentálního stresu váže bakteriální RNA polymerázu, které umožňuje iniciovat transkripci specifických genů. Tímto způsobem potlačuje expresi genů jako *hla* (alfa toxin), naopak podporuje syntézu produktů FnbA (fibronectin-binding protein), či ClfA (clumpingfactor A), tedy v biologii *S. aureus* významných adhezínů, umožňujících vazbu na povrch a tvorbu biofilmu (Bischoff *et al.*, 2004), který patogenovi napomáhá prostředí odolat a snáze se na něj adaptovat (Liu *et al.*, 2018). Mutace v SigB jsou obvykle spojeny s narušenou syntézou biofilmu, některé ji však mohou i podpořit, jako je tomu například u mutací vedoucích k inhibici exprese *nuc*, kódující extracelulární nukleázu, napomáhající rozpadu biofilmu (Liu *et al.*, 2018). Aktivita SigB také například spojena s produkcí zlatého pigmentu stafyloxantinu, látky, důležité pro přežití oxidativního stresu, způsobeného molekulami ROS ze strany hostitele. Biosyntéza zlatého karotenoidního pigmentu je u *S. aureus* řízena operonem *crtOPQMN* (Pelz, 2005), přičemž bylo zjištěno, že inhibice syntézy tohoto pigmentu virulenci zřetelně snižuje (Clauditz, 2006).

Významná je také interakce SigB s důležitými stafylokokovými regulačními systémy, jako je *agr*. Je známo, že SigB potlačuje syntézu *tst* genu, kódující toxin syndromu toxického šoku (TSST-1). Snížená aktivita SigB má za následek zvýšenou expresi z P3 promotoru *agr* a s ním spojenou produkci regulační RNAIII, která podporuje virulenci a potlačuje tvorbu biofilmu (Andrey *et al.*, 2015).

SigB reakce je odpovědí na enviromentální stres. Ten může být různého původu, například nutriční, či fyzikální stres. Dle povahy stresu totiž reagují odlišné komponenty kaskády. Odpověď zahajují proteiny RsbU reagující na fyzikální, a RsbP na nutriční stres. Stresové podmínky, způsobené fyzikálními faktory vedou k aktivaci kinázy RsbT, která se

po fosforylaci vyvazuje ze svého komplexu s proteiny RsbS a RsbRA a následně RsbT aktivuje fosfatázu RsbU. Jak RsbU, tak RsbP jsou fosfatázy typu 2C.

Regulaci tohoto mechanismu dále zprostředkovává RsbX, fosfatáza, která defosforyluje RsbT a spuštění kaskády zamezuje (Senn *et al.*, 2005). Druhou výkonnou fosfatázou je RsbP, která pro svou aktivitu vyžaduje RsbQ, hydrolázu, jejíž úloha ve funkci RsbP doposud není jasná, předpokládá se však hydrolýza a poskytnutí esenciálního kofaktoru pro RsbP (Pané-Farré *et al.*, 2009). Podobný mechanismus můžeme nalézt u *B. subtilis*, ovšem pouze s fosfatázou RsbU (mechanismus obou regulačních drah popisuje obrázek 6).



Obr. 6: Mechanismus SigB regulačních kaskád *S. aureus* v závislosti na povaze stresových faktorů (A). Regulační dráha závislá na fyzikálních stresových podmínkách vede k vyvázání z komplexu a aktivaci kinázy RsbT, která následně aktivuje fosfatázu RsbU, společnou jak pro dráhu reagující na fyzický stres, tak dráhu odpovídající na nutriční stresové podmínky. Tuto dráhu zprostředkovávají dráhy nutriční odpovědi RsbP a RsbQ (Senn *et al.*, 2005).

V dalších krocích regulační kaskády nachází dále uplatnění trojice výkonných proteinů RsbV, RsbW a samotný SigB. Reakce je spuštěna defosforylací tzv. anti-anti sigma faktoru RsbV, čímž se aktivuje a je schopen vytěsnit SigB z komplexu s anti-sigma faktorem RsbW. Aktivita spouštěcího proteinu RsbV je řízena reverzibilní fosforylací na serinu v pozici 56, čímž dochází k jeho inaktivaci. Vytěsněný SigB může následně interagovat s RNA polymerázou, která zahajuje transkripci ze SigB-závislých promotorů (Senn *et al.*, 2005).

8.2 CcpA regulační systém

Další významnou komponentou řídící virulenci, odpovídající na nutriční podmínky je tzv. catabolite control protein A CcpA. Tento protein z rodiny bakteriálních proteinů LacI/GalR (Parente, 2013) funguje v biologii *S. aureus* a dalších gram-pozitivních druhů jakožto regulační molekula, kontrolující růst, metabolismus glukózy a produkci specifických faktorů virulence procesem tzv. katabolické represe (CCR - Carbon Catabolite Repression) (Bronensky *et al.*, 2019). V bakteriálním světě jde o rozšířený systém, který umožňuje řídit expresi konkrétních genů dle dostupnosti preferovaného zdroje uhlíku a omezit expresi těch, které podporují zisk energie z méně dostupných a tedy méně výhodných zdrojů, čímž je ušetřena energie (Li *et al.*, 2010).

Evoluční spřažení s koncentrací glukózy je pro regulační funkce CcpA esenciální, jelikož je v momentě její dostupnosti aktivován (Seidl *et al.*, 2008). Mimo jiné je CcpA také nezbytný k vzniku rezistence na oxacilin (Seidl, 2006).

Je obecně známo, že vysoké koncentrace cukrů napomáhají tvorbě biofilmu a CcpA je regulátorem, který řízením exprese adhezinů a buněčné agregace jeho formování podporuje. Bylo zjištěno, že CcpA pozitivně reguluje transkripci z operonu *ica*, zodpovědného za produkci polysacharidového intercelulárního adhezinu (PIA), esenciálního pro valnou část stafylokokových biofilmů, či *cidA* (mureinová hydroláza) (Rice *et al.*, 2007).

Inhibiční vliv má naopak na geny jako je *tst* (TSST-1, toxin syndromu toxického šoku) (Seidl, 2008). V prostředí bohatém na glukózu je schopen aktivovat expresi *hla*, genu kódující alfa toxin, jeden z hlavních virulenčních faktorů *S. aureus*. Tento fakt vysvětluje závažnost infekcí *S. aureus* u pacientů trpících hyperglykemií (Bischoff *et al.*, 2017).

V přítomnosti glukózy dochází k tvorbě komplexu s ko-regulační molekulou Hpr a aktivaci CcpA. Tento partner musí být fosforylován na serinovém zbytku 46 kinázou HprKP. Vzniklý komplex CcpA-Hpr(P) je charakteristický svou schopností vázat cílové DNA elementy, známé jako CRE (catabolite-responsive elements) a modulovat touto vazbou expresi souvisejících genů. Pokud je na threoninových zbytcích fosforylován samotný CcpA, je jeho afinita k cílovým sekvencím inhibována a CcpA ztrácí schopnost CRE vázat. Za tuto fosforylaci zodpovídá serin/threonin kináza Stk1, podílející se svou funkcí v mnoha jiných regulačních systémech *S. aureus* (Débarbouillé *et al.*, 2009).

CcpA je také znám potlačováním exprese malé nekódující sRNA RsaI, která má za cíl antisense regulačním systémem inhibovat permeázu, vychytávající glukózu a enzym FN3K, chránící proteiny před poškozením jejími vysokými koncentracemi (Bronesky *et al.*, 2019).

9 Závěr

Tato práce byla vytvořena, aby shrnula nejvýznamnější molekulární mechanismy, kterými *S. aureus* řídí syntézu širokého spektra faktorů virulence, které mu umožňují invadovat lidské tkáně a způsobit i velmi vážné infekce. Zcela zásadním systémem a křížovatkou ostatních regulačních kaskád je *agr* lokus, spřažený s quorum sensing signalizací. V biologii *S. aureus* zastává *agr* funkci výkonného systému, který řízenou produkcí autoindukčních molekul a přímou či nepřímou integrací dalších regulačních drah ovlivňuje produkci faktorů virulence.

Pochopení molekulárních mechanismů regulujících produkci virulenčních faktorů *S. aureus* a jim podřízených genů se otevírá široké spektrum možností pro cílenou léčbu a to jak na úrovni regulace transkripce konkrétních genů, tak inaktivace jejich produktů, například využitím lidských monoklonárních protilátek (mAbs) (Thammavongsa, 2016). Na úrovni exprese faktorů virulence může být jako příklad cílené léčby uveden inhibiční účinek molekul Inh2-B1, inhibující u rodu *Staphylococcus* rozšířenou a z hlediska virulence důležitou ser/thr protein kinázu Stk1 (Kant, 2017).

Vzhledem k doposud neodhaleným funkcím přídatných regulátorů můžeme soudit, že problematika regulace virulence *S. aureus* je výrazně komplikovanější a její studie je jednou z podstatných výzev moderní medicíny.

10. Seznam použité literatury

Abdelhady W., Bayer A. S., Seidl K., Moormeier D. E., "Impact of Vancomycin on *sarA*-Mediated Biofilm Formation: Role in Persistent Endovascular Infections Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*" *The Journal of Infectious Diseases*, 2014, 209(8): 1231–1240

Altman R., Sullivan J., Chacko K. I., Balasubramanian D., "Genome Plasticity of *agr*-Defective *Staphylococcus aureus* during Clinical Infection" *Infection and immunity*, 2018, 86 (10): 00331-18.

Andrey D. O., Jousselin A., Villanueva M., Renzoni A., *et al.*, "Impact of the Regulators SigB, Rot, SarA and *sarS* on the Toxic Shock *Tst* Promoter and TSST-1 Expression in *Staphylococcus aureus*" *PLoS one*, 2015, 10(8): 0135579.

Bai J., Zhu X., Zhao K., Yan Y. *et al.*, "The role of ArlRS in regulating oxacillin susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* indicates it is a potential target for antimicrobial resistance breakers" *Emerging Microbes & Infections*, 2019, 8(1): 503-515

Barlett A. H., Foster T. J., Hayashida A., Park P. W., "Alpha toxin facilitates the generation of CXC chemokine gradients and stimulates neutrophil homing in *Staphylococcus aureus* pneumonia" *The Journal of Infectious Diseases*, 2008, 98(10): 1529-35

Becker K. A., Fahsel B., Kemper H., Mayeres J., *et al.*, "*Staphylococcus aureus* Alpha-Toxin Disrupts Endothelial-Cell Tight Junctions via Acid Sphingomyelinase and Ceramide" *Infection and Immunity*, 2018, 86(1): 00606-17

Benson M. A., Lilo S., Nygaard T., Voyich J. M., "Rot and SaeRS Cooperate To Activate Expression of the *Staphylococcal* Superantigen-Like Exoproteins" *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(16): 4355–4365.

Berends E. T. M., Zheng X., Zwack E. E., Ménager M. M., Cammer M., Shopsis B., Torres V. J., "*Staphylococcus aureus* Impairs the Function of and Kills Human Dendritic Cells via the LukAB Toxin" *mBio*, 2019, 10(1): 01918-18

Bezar I. F., Mashruwala A. A., Boyd J. M., Stock A. M., "Drug-like Fragments Inhibit *agr*-Mediated Virulence Expression in *Staphylococcus aureus*" *Scientific reports*, 2019, 9(1): 6786

Bischoff M., Wonnenberg B., Nippe N., Nyffengger-Jann N. J., *et al.*, "CcpA Affects Infectivity of *Staphylococcus aureus* in a Hyperglycemic Environment" *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7(5): 1–10

Bischoff M., Brelle S., Minatelli S., Molle V., "Stk1-mediated phosphorylation stimulates the DNA-binding properties of the *Staphylococcus aureus* SpoVG transcriptional factor." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 473(4): 1223-1228

Bischoff M., Dunman P., Kormanec J., Macapagal D., Murphy E., Mounts W., Berger-Bächi B., Projan S., "Microarray-Based Analysis of the *Staphylococcus aureus* σ^B Regulon" *Journal of Bacteriology*, 2004 186(13): 4085–4099

Boisset S., Geissmann T., Huntzinger E., Fechter P., *et al.*, "Staphylococcus aureus RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism" *Genes and Development*, 2007, 21(11): 1353–1366

Brauweiler A. M., Goleva E., Leung D. Y. M., "Th2 cytokines increase *Staphylococcus aureus* alpha toxin-induced keratinocyte death through the signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6)" *The Journal of Investigative Dermatology*, 2014, 134(8): 2114-2121

Bronensky D., Desgranges E., Corvaglia A., François P., *et al.*, "A multifaceted small RNA modulates gene expression upon glucose limitation in *Staphylococcus aureus*" *The EMBO Journal*, 2019, 38(6): 99363

*Canovas J., Baldry M., Boier M. S., Andersen P. S., *et al.*, "Corrigendum: Cross-Talk between *Staphylococcus aureus* and Other *Staphylococcal* Species via the *agr* Quorum Sensing System" *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1949

*Clarke S. R., Foster S. J., "Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*." *Advances in Microbial Physiology*, 2006, 51:187-224.

Clauditz A., Resch A., Wieland K. P., Peschel A., Götz F., "Staphyloxanthin Plays a Role in the Fitness of *Staphylococcus aureus* and Its Ability To Cope with Oxidative Stress" *Infection and Immunity*, 2006, 74(8): 4950–4953

Crosby H., A., Schlievert P. M., Merriman J. A., King J. M., "The *Staphylococcus aureus* Global Regulator MgrA Modulates Clumping and Virulence by Controlling Surface Protein Expression" *PLoS Pathogens*, 2016, 12(5): 1005604

Dastgheyb S. S., Villaruz A. E., Le K., Y., Tan V. Y., "Role of Phenol-Soluble Modulins in Formation of *Staphylococcus aureus* Biofilms in Synovial Fluid" *Infection and Immunity*, 2015, 83(7): 2966–2975

Débarbouillé M., Dramsi S., Dussurget O., Nahori M. A. *et al.*, "Characterization of a Serine/Threonine Kinase Involved in Virulence of *Staphylococcus aureus*" *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(13): 4070–4081

Dufour P., Jarraud S., Vandenesch F., Greenland T., *et al.*, "High Genetic Variability of the *agr* Locus in *Staphylococcus* Species" *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(4): 1180–1186

Dunman P. M., Murphy E., Haney S., Palacios D., "Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci." *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(24): 7341-7353

Fournier B., Klier A., Rapoport G., "The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*" *Molecular Microbiology*, 2001, 41(1): 247-61

- Gaupp R., Wirf J., Wonnenberg B., Biegel T., *et al.*, "RpiRc Is a Pleiotropic Effector of Virulence Determinant Synthesis and Attenuates Pathogenicity in *Staphylococcus aureus*" *Infection and Immunity*, 2016, 84(7): 2031-2041
- Geisinger E., George E. A., Muir T. W., Novick R. P., "Identification of Ligand Specificity Determinants in AgrC, the *Staphylococcus aureus* Quorum-sensing Receptor" *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(14): 8930–8938.
- Geisinger E., Adhikari R. P., Jin R., Ross H. F., Novick R. P., "Inhibition of Rot translation by RNAIII, a key feature of *agr* function" *Molecular Microbiology*, 2006, 61(4): 1038-48
- Grosz M., Kolter J., Paprotka K., Winkler A. C. *et al.*, "Cytoplasmic replication of *Staphylococcus aureus* upon phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulins α " *Cellular Microbiology*, 2014, 16(4): 451-65
- Holden M. T., Hsu L. Y., Kurt K., Weinert L. A., *et al.*, "A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic" *Genome Research*, 2013, 23(4):653-64
- Chan R., Buckley P. T., O'Malley A., Sause W. E., " Identification of biologic agents to neutralize the bicomponent leukocidins of *Staphylococcus aureus*." *Science Translational Medicine*, 2019, 11(475): 0882
- *Cheung A. L., Bayer A. S., Zhang G., Gresham H., "Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*" *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2004, 40(1): 1-9.
- Chi C. Y., Lin C. C., Yao Y. C., "Panton-Valentine leukocidin facilitates the escape of *Staphylococcus aureus* from human keratinocyte endosomes and induces apoptosis." *The Journal of Infectious Diseases*, 2014, 209(2): 224-354
- Chu X., Xia R., He N., Fang Y., "Role of Rot in bacterial autolysis regulation of *Staphylococcus aureus* NCTC8325" *Research in Microbiology*, 2013, 164(7): 695-700
- Ilczyszyn W. M., Sabat A. J., Akkerboom V., Szkarlat A., *et al.*, "Clonal Structure and Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains from Invasive Infections in Paediatric Patients from South Poland: Association between Age, *spa* Types, Clonal Complexes, and Genetic Markers" *PLoS One*, 2016, 11(3): 0151937
- Jelsbak L., Hemmingsen L., Donat S., Ohlsen K., Boye K., Westh H., Ingmer H., Frees D., "Growth phase-dependent regulation of the global virulence regulator Rot in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*" *International Journal of Medical Microbiology*, 2010, 300(4): 229-36

- Jensen R. O., Winzer K., Clarke S. R., Chan W. C., Williams P., " Differential recognition of *Staphylococcus aureus* quorum-sensing signals depends on both extracellular loops 1 and 2 of the transmembrane sensor AgrC." *Journal of Molecular Biology*, 2008, 381(2):300-9
- Jeong D. W., Cho H., Lee H., Li C., Garza J., Fried M., Bae T, "Identification of the P3 promoter and distinct roles of the two promoters of the SaeRS two-component system in *Staphylococcus aureus*." *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(18): 4672–4684
- Jing Ch., Liu Ch., Liu F., Gao Y., "Novel human monoclonal antibodies targeting the F subunit of leukocidins reduce disease progression and mortality caused by *Staphylococcus aureus*" *BMC Bacteriology*, 2018, 18:181
- Kant S., Asthana S., Missiakas D., Pancholi V., "A novel STK1-targeted small-molecule as an “antibiotic resistance breaker” against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*" *Scientific Reports*, 2017, 7: 5067
- Killikelly A., Benson M. A., Ohneck E. A., Sampson J. M ., *et al.*, "Structure-Based Functional Characterization of Repressor of Toxin (Rot), a Central Regulator of *Staphylococcus aureus* Virulence" *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(1): 188–200
- Kim H. K., Falugi F., Missiakas D. M., Schneewind O., "Peptidoglycan-linked protein A promotes T cell-dependent antibody expansion during *Staphylococcus aureus* infection" *PNAS*, 2016, 113(20): 5718–5723
- Koenig R. L., Ray J. L., Maleki S. J., Smeltzer M. S., Hurlburt B. K., "*Staphylococcus aureus* AgrA Binding to the RNAIII-*agr* Regulatory Region" *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(22): 7549–7555
- Koziel J., Chmieszt D., Bryzek D., Kmiecik K., Mizgalska D., "The Janus Face of α -Toxin: A Potent Mediator of Cytoprotection in *Staphylococci* Infected Macrophages" *Journal of Innate Immunity*, 2015, 7(2): 187–198
- Kumar K., Chen J., Drlica K., Shopsin B., "Tuning of the Lethal Response to Multiple Stressors with a Single-Site Mutation during Clinical Infection by *Staphylococcus aureus*" *mBio*, 2017, 8(5): 01476-17
- Le V. T. M., Le H. N., Pinheiro M. G., Hahn K. J. *et al.*, "Effects of Tedizolid Phosphate on Survival Outcomes and Suppression of Production of *Staphylococcal* Toxins in a Rabbit Model of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Necrotizing Pneumonia" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(4): 02734-16
- Le V. T., Tkaczyk C., Chau S., Rao R. L., *et al.*, "Critical Role of Alpha-Toxin and Protective Effects of Its Neutralization by a Human Antibody in Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(10): 5640-8

- Leiba J., Hartmann T., Cluzel M. E., Cohen-Gonsaud M., *et al.*, "A novel mode of regulation of the *Staphylococcus aureus* catabolite control protein A (CcpA) mediated by Stk1 protein phosphorylation" *Journal of Biological Microbiology*, 2012, 287(52): 43607–43619
- Li D., Cheung A., "Repression of *hla* by *rot* Is Dependent on *sae* in *Staphylococcus aureus*" *Infection and Immunity*, 2008, 76(3): 1068–1075
- Li Ch., Sun F., Cho H., Yelavarth V., *et al.*, "CcpA Mediates Proline Auxotrophy and Is Required for *Staphylococcus aureus* Pathogenesis" *Journal of Microbiology*, 2010, 192(15): 3883–3892
- Lioliou E., Sharma C. M., Caldelari I., Helfer A. C., *et al.*, "Global Regulatory Functions of the *Staphylococcus aureus* Endoribonuclease III in Gene Expression" *PLoS*, 2012, Genetics 8(6): 1002782
- Liu H., Shang W., Hu Z., Zheng Y., *et al.*, "A novel SigB (Q225P) mutation in *Staphylococcus aureus* retains virulence but promotes biofilm formation" *Emerging Microbes and Infections*, 2018, 7:72
- *Liu Q., Yeo W. S., Bae T., "The SaeRS Two-Component System of *Staphylococcus aureus*" *Genes*, 2016 (a), 7(10): 81
- Liu Y., Zhang S., Sun B., "SpoVG Regulates Cell Wall Metabolism and Oxacillin Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain N315" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016 (b), 60(6): 3455–3461
- Löffler B., Hussain M., Grundmeier M., Brück M., "*Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine Leukocidin Is a Very Potent Cytotoxic Factor for Human Neutrophils" *PLoS Pathogens*, 2010, 6(1): 1000715
- Ma B., Zhang H. Y., Bai X., Wang F., Ren X. H., Zhang L., Zhang M. Z., "ADAM10 mediates the cell invasion and metastasis of human esophageal squamous cell carcinoma via regulation of E-cadherin activity" *Oncology Reports*, 2016, 35(5): 2785-94
- Maineiero M., Goerke C., Geiger T., Gonser C., Herbert S., Wolz C., 2010
"Differential target gene activation by the *Staphylococcus aureus* two-component system *saeRS*" *Journal of Bacteriology* 192(3): 613-23
- Majerczyk C. D., Saydkov M. R., Luong T. T., Lee C., Somerville G. A., Sonenshein A. L., "*Staphylococcus aureus* CodY Negatively Regulates Virulence Gene Expression" *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(7): 2257–2265

- Manna A. C., Ingavale S. S., Maloney M., van Wamel W., Cheung A. L., "Identification of *sarV* (SA2062), a New Transcriptional Regulator, Is Repressed by SarA and MgrA (SA0641) and Involved in the Regulation of Autolysis in *Staphylococcus aureus*" *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(16): 5267–5280
- Manna A. C., Cheung A. L., "*sarU*, a *sarA* Homolog, Is Repressed by SarT and Regulates Virulence Genes in *Staphylococcus aureus*" *Infection and Immunity*, 2003, 71(1): 343–353
- Manna A., Cheung A. L., "Characterization of *sarR*, a Modulator of *sar* Expression in *Staphylococcus aureus*" *Infection and Immunity*, 2001, 69(2): 885–896
- Miyazaki E., Chen J. M., Ko Ch., Bishai W. R., "The *Staphylococcus aureus* *rsbW* (*orf159*) Gene Encodes an Anti-Sigma Factor of SigB" *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(9): 2846–2851
- Mlynek K. D., Sause W. E., Moormeier D. E., Saydkov M. R., "Nutritional Regulation of the Sae Two-Component System by CodY in *Staphylococcus aureus*" *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(8): 00012-18
- Mootz J. M., Benson M. A., Heim C. E., Crosby H. A., *et al.*, "Rot is a key regulator of *Staphylococcus aureus* biofilm formation" *Molecular Microbiology*, 2015, 96(2): 388–404.
- Oscarsson J., Arvidson S., Harlos C., "Regulatory role of proteins binding to the *spa* (protein A) and *sarS* (*staphylococcal* accessory regulator) promoter regions in *Staphylococcus aureus* NTCC 8325-4." *International Journal of Medical Microbiology*, 2005, 22 (4): 253-66.
- Otto M., Echner H., Voelter W., Götz F., "Pheromone Cross-Inhibition between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*" *Infection and Immunity*, 2001, 69(3): 1957–1960
- Paharik A. E., Parlet C. P., Chung N., Todd D. A., "Coagulase-Negative *Staphylococcal* Strain Prevents *Staphylococcus aureus* Colonization and Skin Infection by Blocking Quorum Sensing" *Cell Host Microbe*, 2017, 22(6): 746–756
- Pan X., Chen X., Su X., Feng Y., Tao Y., Dong Z., "Involvement of SpoVG in hemolysis caused by *Bacillus subtilis*" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 443(3): 899-904
- Pané-Farré J., Jonas B., Hardwick S. W., Gronau K., *et al.*, 2009 "Role of RsbU in Controlling SigB Activity in *Staphylococcus aureus* following Alkaline Stress" *Journal of Microbiology*, 2009, 191(8): 2561–2573
- Parente D. J., Swint-Kruse L., "Multiple Co-Evolutionary Networks Are Supported by the Common Tertiary Scaffold of the LacI/GalR Proteins" *PLoS One*, 2013 8(12): 84398

- Pedrosa Soares C. R., Rodrigues de Lira C., Cunha M. A. H., de Souza Junior V. H., *et al.*, "Prevalence of nasal colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in outpatients living with HIV/AIDS in a Referential Hospital of the Northeast of Brazil" *BMC Research Notes*, 2018, 11: 794
- Pelz A., Wieland K. P., Putzbach K., Hentschnel P., Albert K., Götz F. *et al.*, "Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*" *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(37): 32493-8
- Peng H., Li C., Kadow S., Henry B. D., *et al.*, 2015 "Acid sphingomyelinase inhibition protects mice from lung edema and lethal *Staphylococcus aureus* sepsis" *Journal of Molecular Medicine*, 2015, 93(6): 675–689
- Pietrocola G., Nobile G., Alfeo M. J., Foster T. J., Goeghegan J. A., De Filippis V., Speziale P., "Fibronectin-binding protein B (FnBPB) from *Staphylococcus aureus* protects against the antimicrobial activity of histones" *The Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(10): 3588-3602
- Rechtin T. M., Gillaspay A. F., Schumacher M. A., Brennan R. G., Smeltzer M. S., Hurlburt B. K., "Characterization of the SarA virulence gene regulator of *Staphylococcus aureus*" *Molecular Microbiology*, 1999, 33(2):307-16
- Ren L. R., Wang H., He Y. Q., Song M. G., Chen X. Q., Xu Y. Q., "*Staphylococcus aureus* Protein A induces osteoclastogenesis via the NF- κ B signaling pathway" *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16(5): 6020–6028
- Reynolds J., Wigneshwerarai S., "Molecular insights into the control of transcription initiation at the *Staphylococcus aureus agr* operon" *Journal of Molecular Biology*, 2011, 412(5): 862-81
- Rice K. C., Mann E. E., Endres J. L., Weiss E. C., Cassat J. E., Smeltzer M. S., Bayles K. W., "The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*" *PNAS*, 2007, 104(19): 8113-8
- Richardson J. R., Armbruster N. S., Günter M., Henes J., Autenrieth S. E., "*Staphylococcus aureus* PSM Peptides Modulate Human Monocyte-Derived Dendritic Cells to Prime Regulatory T Cells" *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 2603
- *Rutherford S. T., Bassler B. L., "Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control" *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2012, 2(11): 012427
- Said-Salim B., Dunman P. M., McAleese F. M., Macapagal D., "Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot." *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(2): 610-9

- Salvador V. B. D., Chapagain B., Joshi A., Brennessel D. J., "Clinical Risk Factors for Infective Endocarditis in *Staphylococcus aureus* Bacteremia" *Texas Heart Institute Journal*, 2017, 44(1): 10–15
- Seidl K., Goerke Ch., Wolz Ch., Mack D., *et al.*, "*Staphylococcus aureus* CcpA Affects Biofilm Formation" *Infection and Immunity*, 2008, 76(5): 2044–2050
- Seidl K., Stucki M., Ruegg M., Goerke Ch., *et al.*, "*Staphylococcus aureus* CcpA Affects Virulence Determinant Production and Antibiotic Resistance" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(4): 1183–1194
- Senn M. M., Giachino P., Homerova D., Steinhuber A., "Molecular Analysis and Organization of the σ^B Operon in *Staphylococcus aureus*" *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(23): 8006–8019
- Shambat M. S., Hagggar A., Vandenesch F., Lina G., *et al.*, "Levels of alpha-toxin correlate with distinct phenotypic response profiles of blood mononuclear cells and with *agr* background of community-associated *Staphylococcus aureus* isolates" *PLoS One*, 2014, 9(8): 106107
- Shang F., Xue T., Sun H., Xing L., *et al.*, "The *Staphylococcus aureus* GGDEF Domain-Containing Protein, GdpS, Influences Protein A Gene Expression in a Cyclic Diguanylic Acid-Independent Manner" *Infection and Immunity*, 2009, 77(7): 2849–2856
- *Schmidt K. A., Manna A. C., Cheung A. L., "SarT Influences *sarS* Expression in *Staphylococcus aureus*" *Infection and Immunity*, 2003, 71(9): 5139–5148
- Schmidt K. A., Manna A. C., Gill S., Cheung A. L., "SarT, a Repressor of α -Hemolysin in *Staphylococcus aureus*" *Infection and Immunity*, 2001, 69(8): 4749–4758
- Schmidt T., Kock M. M., Ehlers M. M., "Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis and Close Human Contacts in South African Dairy Herds: Genetic Diversity and Inter-Species Host Transmission" *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 511
- Schulthess B., Bloes D. A., François P., Girard M., *et al.*, "The σ^B -Dependent *yabJ-spoVG* Operon Is Involved in the Regulation of Extracellular Nuclease, Lipase, and Protease Expression in *Staphylococcus aureus*" *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(18): 4954–4962
- Schwartz K., Sekedat M. D., Syed A. K., O'Hara B., *et al.*, "The AgrD N-Terminal Leader Peptide of *Staphylococcus aureus* Has Cytolytic and Amyloidogenic Properties" *Infection and Immunity*, 2014, 82(9): 3837–3844

Soltani E., Farrokhi E., Zamanzad B., Abadi M. S. S., *et al.*, "Prevalence and distribution of adhesins and the expression of fibronectin-binding protein (FnbA and FnbB) among *Staphylococcus aureus* isolates from Shahrekord Hospitals" *BMC Research Notes*, 2019, 12: 49

*Sommerville G. A., Proctor R. A., "At the Crossroads of Bacterial Metabolism and Virulence Factor Synthesis in *Staphylococci*" *Microbiology and Molecular biology Reviews*, 2009, 73(2): 233–248

Spaan A. N., Henry T., van Rooijen W. J. M., Perret M., "The *staphylococcal* toxin Panton-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors" *Cell Host & Microbe*, 2013, 13(5):584-594

Strauß L., Stegger M., Akpaka P. E., Alabi A. *et al.*, "Origin, evolution, and global transmission of community-acquired *Staphylococcus aureus* ST8" *PNAS*, 2017, 114(49): 10596–10604

Tahmasebi H., Dehbashi S., Arabestani M. R., "Association between the accessory gene regulator (*agr*) locus and the presence of superantigen genes in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*" *BMC Research Notes*, 2019, 12: 1307

Tamber S., Cheung A. L., "SarZ Promotes the Expression of Virulence Factors and Represses Biofilm Formation by Modulating SarA and *agr* in *Staphylococcus aureus*" *Infection and Immunity*, 2009, 77(1): 419–428

*Tan L., Li S. R., Jiang B., Hu Y. M., Li S., "Therapeutic Targeting of the *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator (*agr*) System" *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 55

Thammavongsa V., Rauch S., Kim H. K., Missiakas D. M., Schneewind O., "Protein A-neutralizing monoclonal antibody protects neonatal mice against *Staphylococcus aureus*" *HSS Public Access*, 2015, 33(4): 523–526

Tuchscher L., Bischoff M., Lattar S. M., Llana M. N., *et al.*, "Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections" *PLoS Pathogens*, 2015, 11(4): 1004870

*Verbeke F., De Craemer S., Debunne N., Janssens Y., *et al.*, "Peptides as Quorum Sensing Molecules: Measurement Techniques and Obtained Levels *In vitro* and *In vivo*" *Frontiers in Neuroscience*, 2017, 11: 183

Von Hoven G., Rivas A. J., Neukirch C., Klein S. *et al.*, "Dissecting the role of ADAM10 as a mediator of *Staphylococcus aureus* α -toxin action" *The Biochemical Journal*, 2016, 473(13): 1929-40

- Walker J. N., Crosby H. A., Spaulding A. R., Salgado-Pabón W., *et al.*, "The *Staphylococcus aureus* ArlRS two-component system is a novel regulator of agglutination and pathogenesis" *PLoS Pathogens*, 2013, 9(12): 1003819
- Wang B., Zhao A., Novick R., Muir T. W., "Activation and Inhibition of the Receptor Histidine Kinase AgrC Occurs Through Opposite Helical Transduction Motions" *Mol Cell*, 2014, 53(6): 929–940
- Wang R., Braughton K. R., Kretschmer D., Bach T. H., *et al.*, "Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA" *Nature Medicine*, 2007, 13(12): 1510-4
- Waters N. R., Samuels D. J., Behera R. K., Livny J., "A spectrum of CodY activities drives metabolic reorganization and virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*" *Molecular Microbiology*, 2016, 101(3): 495-514
- Wright III J. S., Lyon G. A., George E. A., Muir T. W., Novick R. P., "Hydrophobic interactions drive ligand-receptor recognition for activation and inhibition of *Staphylococcal* quorum sensing" *PNAS*, 2004, 101(46): 16168–16173
- Xiong Y. Q., Willard J., Yeaman M. R., Cheung A. L., Bayer A. S., "Regulation of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin gene (*hla*) expression by *agr*, *sarA*, and *sae* in vitro and in experimental infective endocarditis" *The Journal of Infectious Diseases*, 2006, 194(9): 1267-75
- Yang J., Liang X., Ji Y., "The novel transcriptional regulator SA1804 Is involved in mediating the invasion and cytotoxicity of *Staphylococcus aureus*" *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 174
- Zhang L., Gray L., Novick R. P., Ji G., *et al.*, "Transmembrane topology of AgrB, the protein involved in the post-translational modification of AgrD in *Staphylococcus aureus*" *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(38): 34736-42
- Zhang X., Hu X., Rao X., "Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* toxins" *Microbiological Research*, 2017, 205: 19-24
- Zhou Ch., Bhinderwala F., Lehman M. K., Thomas V. C., *et al.*, "Urease is an essential component of the acid response network of *Staphylococcus aureus* and is required for a persistent murine kidney infection" *PLoS Pathogens*, 2019, 15(1): 1007538
- Zhu Q., Wen W., Wang W., Sun B., "Transcriptional regulation of virulence factors Spa and ClfB by the SpoVG-Rot cascade in *Staphylococcus aureus*" *International Journal of Medical Microbiology*, 2019, 309(1): 39-53

*sekundární citace